

# PATENT COOPERATION TREATY

PCT/CN99/00132

## PCT

### NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C.20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

<b>Date of mailing</b> (day/month/year) 12 May 2000 (12.05.00)	
<b>International application No.</b> PCT/CN99/00132	<b>Applicant's or agent's file reference</b> 982685 1PC
<b>International filing date</b> (day/month/year) 30 August 1999 (30.08.99)	<b>Priority date</b> (day/month/year) 31 August 1998 (31.08.98)
<b>Applicant</b> YU, Long et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

27 March 2000 (27.03.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

<b>The International Bureau of WIPO</b> 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland  Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	<b>Authorized officer</b>  Pascal Piriou  Telephone No.: (41-22) 338.83.38
--	--

## WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION

International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51)International Patent Classification <sup>6</sup> :  <b>C12N 15/56,9/36, C07K 16/40</b>	<b>A1</b>	(11)International Publication Number: <b>WO00/12723</b>  (43)International Publication Dater: <b>9 March 2000 (09.03.2000)</b>	
(21)International Application Number: <b>PCT/CN99/00132</b>  (22) International Filing Date: <b>30 August 1999 (30.08.1999)</b>  (30) Priority Data: <b>98111041.X      31 August 1998(31.08.1998)      CN</b>  (71)(72) Applicant/ Inventor: YU, Long [CN/CN]; Handan Road 220, Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai 200433 (CN)  (72) Inventor; and (75) Inventor/Applicant( <i>for US only</i> ): FU, Qiang [CN/CN]; ZHAO, Yong [CN/CN]; ZHANG Honglai [CN/CN]; BI, Anding [CN/CN]; Handan Road 220, Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai 200433 (CN)  (74) Agent: Shanghai Patent & Trademark Law Office; Guiping Road 435, Shanghai 200233, P.R.China (CN)		(81)Designated States: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO patent(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)  Published With international search report.	
(54)Title: <u>A NOVEL HUMAN LYSOZYME GENE, ITS ENCODED POLYPEPTIDE AND THE METHOD FOR PREPARING THEM</u>  (57)Abstract  <p>The invention relates to a novel member LYC3 of lysozyme gene family. The invention provides the cDNA sequence encoding for the novel lysozyme, the polypeptide encoded by the sequence, as well as the method for producing said novel human lysozyme utilizing recombinant technology. The invention also provides the use of the novel human lysozyme.</p>			

PCT/CN99/00132

PCT

世界知识产权组织  
国际局

## 按照专利合作条约(PCT)所公布的国际申请

(51) 国际专利分类号: <b>C12N 15/56, 9/36, C07K 16/40</b>	<b>A1</b>	(11) 国际公布号: <b>WO00/12723</b>  (43) 国际公布日: <b>2000年3月9日(09.03.2000)</b>
(21) 国际申请号: <b>PCT/CN99/00132</b> (22) 国际申请日: <b>1999年8月30日(30.08.1999)</b> (30) 优先权: <b>98111041.X 1998年8月31日(31.08.1998) CN</b> (71)(72) 发明人/申请人: 余龙(YU, Long) [CN/CN]; 中国上海市邯郸路220号复旦大学遗传学研究所, 邮政编码: 200433, Shanghai (CN). (72) 发明人;及 (75) 发明人/申请人(仅对美国): 傅强(FU, Qiang) [CN/CN]; 赵勇(ZHAO, Yong) [CN/CN]; 张宏来(ZHANG, Hong-lai) [CN/CN]; 毕安定(BI, Anding) [CN/CN]; 中国上海市邯郸路220号复旦大学遗传学研究所, 邮政编码: 200433, Shanghai (CN). (74) 代理人: 上海专利商标事务所(SHANGHAI PATENT & TRADEMARK LAW OFFICE); 中国上海市桂平路435号, 邮政编码: 200233, Shanghai (CN).		(81) 指定国: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO专利(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI专利(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)  本国际公布: 包括国际检索报告。
(54) Title: A NOVEL HUMAN LYSOZYME GENE, ITS ENCODING POLYPEPTIDE AND THE METHOD FOR PREPARING THEM		
(54) 发明名称: 一种新的人溶菌酶基因、其编码的多肽及制备方法		
(57) Abstract <p>The invention relates to a member LYC3 of a novel lysozymes gene family. The invention provides the cDNA sequence encoding for the novel lysozyme, the polypeptide encoded by the sequence, as well as the method producing said novel human lysozyme utilising recombinant technology. The invention also provides the use of the novel human lysozyme.</p>		

## (57) 摘要

本发明涉及了一种新的溶菌酶基因家族的成员 LYC3。本发明提供了该新溶菌酶的 cDNA 编码序列、该序列编码的多肽，以及利用重组技术生产所述的新的溶菌酶的方法。本发明还提供了这种新人溶菌酶的应用。

## 以下内容仅供参考

在按照PCT所公布的国际申请小册子首页上所采用的PCT成员国国家代码如下：

AE 阿拉伯联合酋长国	DK 丹麦	KP 朝鲜民主主义人民共和国	RO 罗马尼亚
AG 安提瓜和巴布亚	DM 多米尼加	KR 韩国	RU 俄罗斯联邦
AL 阿尔巴尼亚	DZ 阿尔及利亚	KZ 哈萨克斯坦	SD 苏丹
AM 亚美尼亚	EE 爱沙尼亚	LC 圣卢西亚	SE 瑞典
AT 奥地利	ES 西班牙	LI 列支敦士登	SG 新加坡
AU 澳大利亚	FI 芬兰	LK 斯里兰卡	SI 斯洛文尼亚
AZ 阿塞拜疆	FR 法国	LR 利比里亚	SK 斯洛伐克
BA 波斯尼亚-黑塞哥维那	GA 加蓬	LS 莱索托	SL 塞拉利昂
BB 巴巴多斯	GB 英国	LT 立陶宛	SN 塞内加尔
BE 比利时	GD 格拉纳达	LU 卢森堡	SZ 斯威士兰
BF 布基纳法索	GE 格鲁吉亚	LV 拉托维亚	TD 乍得
BG 保加利亚	GH 加纳	MA 摩洛哥	TG 多哥
BJ 贝宁	GM 冈比亚	MC 摩纳哥	TJ 塔吉克斯坦
BR 巴西	GN 几内亚	MD 摩尔多瓦共和国	TM 土库曼斯坦
BY 白俄罗斯	GR 希腊	MG 马达加斯加	TR 土耳其
CA 加拿大	GW 几内亚比绍	MK 前南斯拉夫马其顿共和国	TT 特立尼达和多巴哥
CF 中非共和国	HR 克罗地亚	ML 马里	TZ 坦桑尼亚
CG 刚果	HU 匈牙利	MN 蒙古	UA 乌克兰
CH 瑞士	ID 印度尼西亚	MR 毛里塔尼亚	UG 乌干达
CI 科特迪瓦	IE 爱尔兰	MW 马拉维	US 美国
CM 喀麦隆	IL 以色列	MX 墨西哥	UZ 乌兹别克斯坦
CN 中国	IN 印度	NE 尼日尔	VN 越南
CR 哥斯达黎加	IS 冰岛	NL 荷兰	YU 南斯拉夫
CU 古巴	IT 意大利	NO 挪威	ZA 南非
CY 塞浦路斯	JP 日本	NZ 新西兰	ZW 津巴布韦
CZ 捷克共和国	KE 肯尼亚	PL 波兰	
DE 德国	KG 吉尔吉斯斯坦	PT 葡萄牙	

## 一种新的人溶菌酶基因、其编码的多肽及制备方法

### 发明领域

5 本发明涉及一种新的多核苷酸，由该多核苷酸编码的多肽，这些多核苷酸和多肽的应用，以及所述多核苷酸和所述多肽的生产方法。更具体地说，本发明的多肽被推断鉴定为溶菌酶家族的一个新成员。

### 背景技术

溶菌酶广泛存在于生物体的各个部分中，包括各种组织、器官和血清，鸡蛋清中的含量尤为丰富，它主要由特定的腺体上皮细胞或是某些白细胞分泌产生。

10 溶菌酶最早见诸报导是在1922年由Fleming等发表的论文。自那以后，溶菌酶被从各个不同的角度进行了广泛的研究，例如它晶体结构、蛋白催化结构域、催化动力学、免疫学、分子进化学等方面已发表了大量的文献。溶菌酶已成为研究最广泛、最深入的蛋白质之一。但是，关于溶菌酶基因的研究还开展的很不够。迄今为止只有少数物种的溶菌酶基因已被克隆：如大肠杆菌T4溶菌酶、沙门氏菌  
15 P22噬菌体溶菌酶、杆菌 $\phi$ 噬菌体溶菌酶、鸡溶菌酶等等(1983 J. Mol. Biol. 165, 229-248; 1985 Virology 143,280-289.; 1987 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 955-958.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 5759-5763), 人中有关溶菌酶基因克隆方面的报道也已有相关文献公布(1988 Gene 66, 223-234.)。

20 溶菌酶的主要作用是通过裂解细菌细胞壁的NAM(N-乙酰胞壁酸)和NAG(N-乙酰葡萄糖酸)间的 $\beta$  (1-4)糖苷键而达到裂解细胞的效果。生物体中溶菌酶作为一种非特异性的免疫分子具有抗细菌感染作用，在肠道内及一些依靠细菌生存的软体动物中还被作为一种消化酶起作用。溶菌酶还有抑制肿瘤生长的功能。正是由于溶菌酶具有上述功能，所以它无论在工业上还是在医学上都有重要的应用价值。

25

### 发明概述

本发明的一个目的是提供一种新的多核苷酸，该多核苷酸编码溶菌酶基因家族的一个新成员，本发明的溶菌酶被命名为LYC3。

30 本发明的另一个目的是提供一种新的溶菌酶蛋白家族成员，该酶被命名为LYC3。

本发明的再一个目的是提供一种利用重组技术生产所述的新的人溶菌酶的方法。

本发明还涉及这种人溶菌酶基因序列和多肽的应用。

在本发明的一个方面，提供了一种分离出的DNA分子，它包括：编码具有人LYC3蛋白活性的多肽的核苷酸序列，所述的核苷酸序列与SEQ ID NO: 3中从核苷酸81-521位的核苷酸序列有至少70%的同源性；或者所述的核苷酸序列能在中度严紧条件下与SEQ ID NO: 3中从核苷酸81-521位的核苷酸序列杂交。较佳地，所述的序列编码一多肽，该多肽具有SEQ ID NO: 4所示的序列或SEQ ID NO: 4中20-148位氨基酸序列。更佳地，该序列是SEQ ID NO: 3中81-521位的核苷酸序列。

在本发明的另一方面，提供了一种分离的LYC3蛋白多肽，它包括：具有SEQ ID NO: 4氨基酸序列或SEQ ID NO: 4中20-148位氨基酸序列的多肽、或其活性片段，或其活性衍生物。较佳地，该多肽是具有SEQ ID NO: 4序列的多肽。

在本发明的另一方面，提供了一种载体，它含有上述分离出的DNA。

在本发明的另一方面，提供了一种所述载体转化的宿主细胞。

在本发明的另一方面，提供了一种产生具有LYC3蛋白活性的多肽的方法，

该方法包括：

(a)将编码具有LYC3蛋白活性的多肽的核苷酸序列可操作地连于表达调控序列，形成LYC3蛋白表达载体，所述的核苷酸序列与SEQ ID NO: 3中从核苷酸81-521位的核苷酸序列有至少70%的同源性；

(b)将步骤(a)中的表达载体转入宿主细胞，形成LYC3蛋白的重组细胞；

(c)在适合表达LYC3蛋白多肽的条件下，培养步骤(b)中的重组细胞；

(d)分离出具有LYC3蛋白活性的多肽。

在本发明的一个具体实施方案中，本发明的分离的多核苷酸全长为583个核苷酸，其详细序列见SEQ ID NO: 3，其中开放读框位于81-521位核苷酸。

在本发明中，“分离的”、“纯化的”或“基本纯的”DNA是指，该DNA或片段已从天然状态下位于其两侧的序列中分离出来，还指该DNA或片段已经与天然状态下伴随核酸的组份分开，而且已经与在细胞中伴随其的蛋白质分开。

在本发明中，术语“LYC3蛋白(或多肽)编码序列”指编码具有LYC3蛋白活性的多肽的核苷酸序列，如SEQ ID NO: 3中81-521位核苷酸序列及其简并序列。该简并序列是指，位于SEQ ID NO: 3序列的编码框81-521位核苷酸中，有一个或多个密码子被编码相同氨基酸的简并密码子所取代后而产生的序列。由于密码子的简并性，所以与SEQ ID NO: 3中81-521位核苷酸序列同源性低至约70%的简并序列也能编码出SEQ ID NO: 4所述的序列。该术语还包括能在中度严紧条件下与

SEQ ID NO: 3中从核苷酸81-521位的核苷酸序列杂交的核苷酸序列。此外，该术语还包括与SEQ ID NO: 3中从核苷酸81-521位的核苷酸序列的同源性至少70%，更佳地至少80%，更佳地至少90%的核苷酸序列。此外，该术语还包括了仅编码去除了信号肽后的成熟蛋白的核苷酸序列，如SEQ ID NO:3中从135 - 521位的核苷酸序列。

该术语还包括能编码具有与人LYC3相同功能的蛋白的、SEQ ID NO: 3序列的变异形式。这些变异形式包括(但并不限于): 若干个(通常为1 - 90个, 更佳地1 - 60个, 更佳地1 - 20个, 最佳地1 - 10个)核苷酸的缺失、插入和/或取代, 以及在5'和/或3'端添加数个(通常为60个以内, 更佳地为30个以内, 更佳地为10个以内, 最佳地为5个以内)核苷酸。

在本发明中, “基本纯的”蛋白质或多肽是指其至少占样品总物质的至少20%, 更佳地至少50%, 更佳地至少80%, 最佳地至少90%(按干重或湿重计)。纯度可以用任何合适的方法进行测量, 如用柱层析、PAGE或HPLC法测量多肽的纯度。基本纯的多肽基本上不含天然状态下的伴随其的组分。

在本发明中, 术语“LYC3蛋白多肽”指具有LYC3蛋白活性的SEQ ID NO: 4序列或SEQ ID NO: 4中20 - 148位氨基酸序列的多肽。该术语还包括具有与人溶菌酶相同功能的、SEQ ID NO: 4序列或SEQ ID NO: 4中20 - 148位氨基酸序列的变异形式。这些变异形式包括(但并不限于): 若干个(通常为1 - 50个, 更佳地1 - 30个, 更佳地1 - 20个, 最佳地1 - 10个)氨基酸的缺失、插入和/或取代, 以及在C末端和/或N末端添加一个或数个(通常为20个以内, 更佳地为10个以内, 更佳地为5个以内)氨基酸。例如, 在本领域中, 用性能相近或相似的氨基酸进行取代时, 通常不会改变蛋白质的功能。又比如, 在C末端和/或N末端添加一个或数个氨基酸通常也不会改变蛋白质的功能。该术语还包括LYC3蛋白的活性片段和活性衍生物。

该多肽的变异形式包括: 同源序列、等位变异体、天然突变体、诱导突变体、在高或低的严谨度条件下能与LYC3 DNA 杂交的DNA所编码的蛋白、以及利用抗LYC3多肽的抗血清获得的多肽或蛋白。本发明还提供了其他多肽, 如包含LYC3多肽或其片段的融合蛋白。除了几乎全长的多肽外, 本发明还提供了LYC3多肽的可溶性片段。通常, 该片段具有LYC3多肽序列的至少约10个连续氨基酸, 通常至少约30个连续氨基酸, 更佳地至少约50个连续氨基酸, 更佳地至少约80个连续氨基酸, 最佳地至少约100个连续氨基酸。

发明还提供LYC3蛋白或多肽的类似物。这些类似物与天然LYC3多肽的差别

可以是氨基酸序列上的差异，也可以是不影响序列的修饰形式上的差异，或者兼而有之。这些多肽包括天然或诱导的遗传变异体。诱导变异体可以通过各种技术得到，如通过辐射或暴露于诱变剂而产生随机诱变，还可通过定点诱变法或其他已知分子生物学的技术。类似物还可以包括具有不同于天然L-氨基酸的残基(如D-氨基酸)的类似物，以及具有非天然存在的或合成的氨基酸(如 $\beta$ 、 $\gamma$ -氨基酸)的类似物。应理解，本发明的多肽并不限于上述例举的代表性的多肽。

修饰(通常不改变一级结构)形式包括：体内或体外的多肽的化学衍生形式如乙酰化或羧基化。修饰还包括糖基化，如那些在多肽的合成和加工中或进一步加工步骤中进行糖基化修饰而产生的多肽。这种修饰可以通过将多肽暴露于进行糖基化的酶(如哺乳动物的糖基化酶或去糖基化酶)而完成。修饰形式还包括具有磷酸化氨基酸残基(如磷酸酪氨酸，磷酸丝氨酸，磷酸苏氨酸)的序列。还包括被修饰从而提高了其抗蛋白水解性能或优化了溶解性能的多肽。

本发明还包括LYC3多肽编码序列的反义序列。这种反义序列可用于抑制细胞内LYC3的表达。

本发明还包括一种探针分子，该分子通常具有LYC3多肽编码序列的8-100个，较佳地15-50个连续核苷酸。该探针可用于检测样品中是否存在编码LYC3的核酸分子。

本发明还包括检测LYC3核苷酸序列的方法，它包括用上述的探针与样品进行杂交，然后检测探针是否发生了结合。较佳地，该样品是PCR扩增后的产物，其中PCR扩增引物对应于LYC3多肽的编码序列，可位于该编码序列的两侧或中间。引物长度一般为20-50个核苷酸。

在本发明中，可选用本领域已知的各种载体，如市售的载体。

在本发明中，术语“宿主细胞”包括原核细胞和真核细胞。常用的原核宿主细胞的例子包括大肠杆菌、枯草杆菌等。常用的真核宿主细胞包括酵母细胞，昆虫细胞、和哺乳动物细胞。较佳地，该宿主细胞是真核细胞，如CHO细胞、COS细胞等。

另一方面，本发明还包括对LYC3 DNA或是其片段编码的多肽具有特异性抗体，尤其是单克隆抗体。这里，“特异性”是指抗体能结合于LYC3基因产物或片段。较佳地，指那些能与LYC3基因产物或片段结合但不识别和结合于其它非相关抗原分子的抗体。本发明中抗体包括那些能够结合并抑制LYC3蛋白的分子，也包括那些并不影响LYC3蛋白功能的抗体。本发明还包括那些能与修饰或未经修饰形式的LYC3基因产物结合的抗体。



本发明不仅包括完整的单克隆或多克隆抗体，而且还包括具有免疫活性的抗体片段，如Fab'或(Fab)<sub>2</sub>片段；抗体重链；抗体轻链；遗传工程改造的单链Fv分子(Ladner等人，美国专利No. 4,946,778)；或嵌合抗体，如具有鼠抗体结合特异性但仍保留来自人的抗体部分的抗体。

5 本发明的抗体可以通过本领域内技术人员已知的各种技术进行制备。例如，纯化的LYC3基因产物或者其具有抗原性的片段，可被施用于动物以诱导多克隆抗体的产生。与之相似的，表达LYC3或其具有抗原性的片段的细胞可用来免疫动物来生产抗体。本发明的抗体也可以是单克隆抗体。此类单克隆抗体可以利用杂交瘤技术来制备(见 Kohler 等人，Nature 256:495, 1975; Kohler 等人，Eur.J.Immunol. 6:511, 1976; Kohler 等人，Eur.J.Immunol. 6:292, 1976; Hammerling  
10 等人，In Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas, Elsevier, N.Y., 1981)。本发明的抗体包括能阻断LYC3功能的抗体以及不影响LYC3功能的抗体。本发明的各类抗体可以利用LYC3基因产物的片段或功能区，通过免疫技术获得。这些片段或功能区可以利用重组方法制备或利用多肽合成仪合成。与LYC3基因产物的未  
15 修饰形式结合的抗体可以用原核细胞(例如*E. Coli*)中生产的基因产物来免疫动物而产生；与翻译后修饰形式结合的抗体(如糖基化或磷酸化的蛋白或多肽)，可以用真核细胞(例如酵母或昆虫细胞)中产生的基因产物来免疫动物而获得。

本发明的人LYC3核苷酸全长序列或其片段通常可以用PCR扩增法、重组法或人工合成的方法获得。对于PCR扩增法，可根据本发明所公开的有关核苷酸序  
20 列，尤其是开放阅读框序列来设计引物，并用市售的cDNA库或按本领域技术人员已知的常规方法所制备的cDNA库作为模板，扩增而得有关序列。当序列较长时，常常需要进行两次或多次PCR扩增，然后再将各次扩增出的片段按正确次序拼接在一起。

一旦获得了有关的序列，就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常  
25 是将其克隆入载体，再转入细胞，然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。

除了用重组法产生之外，本发明蛋白的片段还可用固相技术，通过直接合成肽而加以生产(Stewart 等人，(1969) Solid-Phase Peptide Synthesis, WH Freeman Co., San Francisco; Merrifield J. (1963) J. Am Chem. Soc 85: 2149-2154)。在体外合  
30 成蛋白质可以用手工或自动进行。例如，可以用Applied Biosystems的431A型肽合成仪(Foster City, CA)来自动合成肽。可以分别化学合成本发明蛋白的各片段，然后用化学方法加以连接以产生全长的分子。

本发明蛋白的编码序列还可用于基因定位。例如，通过荧光原位杂交技术(FISH)，将 cDNA 克隆与分裂中期的染色体进行杂交，可以准确地进行染色体定位。该技术可以使用短至约 500bp 的 cDNA；也可以使用长至约 2000bp 或者更长的 cDNA。对于该技术，可参见 Verma 等人, Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, New York(1988)。

一旦序列被定位于染色体上的某个精确位置，将可以将序列在染色体上的物理位置与遗传图谱数据相关联。这些遗传图谱数据是可以获得的，例如通过孟德尔(Mendelian)人遗传数据库(可通过 Johns Hopkins University Welch Medical Library 在网上获得)。然后，通过连锁分析来鉴定基因与已定位于同一染色体区域的疾病之间的相关性。

接着，有必要确定患病个体和健康个体之间的 cDNA 或基因组序列方面的差异。如果某一突变存在于部分或全部患病个体但不存在于正常个体，那么该突变可能就是该疾病的致病因素。

利用本发明蛋白，通过各种常规筛选方法，可筛选出与 LYC3 发生相互作用的物质，如受体、抑制剂或拮抗剂等。

本发明蛋白及其抗体、抑制剂、拮抗剂或受体等，当在治疗上进行施用(给药)时，可提供不同的效果。通常，可将这些物质配制于无毒的、惰性的和药学上可接受的水性载体介质中，其中 pH 通常为约 5 - 8，较佳地 pH 约为 6 - 8，尽管 pH 值可随被配制物质的性质以及待治疗的病症而有所变化。配制好的药物组合物可以通过常规途径进行给药，其中包括(但不限于)：肌内、腹膜内、皮下、皮内、或局部给药。

以本发明的人 LYC3 蛋白为例，可以将其与合适的药学上可接受的载体联用。这类药物组合物含有治疗有效量的蛋白质和药学上可接受的载体或赋形剂。这类载体包括(但不限于)：盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。药物制剂应与给药方式相匹配。本发明的人 LYC3 蛋白可以被制成针剂形式，例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。诸如片剂和胶囊之类的药物组合物，可通过常规方法进行制备。药物组合物如针剂、溶液、片剂和胶囊宜在无菌条件下制造。活性成分的给药量是治疗有效量，例如每天约 1 微克/千克体重 - 约 5 毫克/千克体重。此外，本发明的多肽还可与其他治疗剂一起使用。

当本发明的人 LYC3 蛋白多肽被用作药物时，可将治疗有效剂量的该多肽施用于哺乳动物，其中该治疗有效剂量通常至少约 10 微克/千克体重，而且在大多数

情况下不超过约8毫克/千克体重，较佳地该剂量是约10微克/千克体重 - 约1毫克/千克体重。当然，具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因素，这些都是熟练医师技能范围内的。

在本发明的一个实施方案中，本发明的多核苷酸全长为544个核苷酸，其详细序列见SEQ ID NO: 3，其中开放读框位于106-252位核苷酸。该多核苷酸是如此获得的，以人脑  $\lambda$  gt11cDNA文库(购自Clontech公司)为模板，合成正向引物A1: 5'-AGAGTGGTGGTGGCTCCACTCTG -3' 和 反向引物 B1: 5'-TGCTGTGCATGGTTCCGTCCATC-3'进行PCR，获得544bp的目的片段。测序后得到SEQ ID NO: 3的全长cDNA序列。

根据同源比较的结果，本发明的核苷酸序列及其编码的蛋白质序列与不同来源的溶菌酶显示了显著的同源性，因此，这表明它是溶菌酶家族的一个新成员，并且具有溶菌酶家族蛋白的一些重要功能。

溶菌酶可以通过裂解细菌细胞壁的NAM(N-乙酰胞壁酸)和NAG(N-乙酰葡萄糖酸)间的 $\beta$  (1-4)糖苷键而达到裂解细胞的效果。生物体中溶菌酶作为一种非特异性的免疫分子具有抗细菌感染作用，在肠道内及一些依靠细菌生存的软体动物中还被作为一种消化酶起作用。溶菌酶还有抑制肿瘤生长的功能。1955年，Caselli 和 Shumacher(1955 Boll Ocul 34:513-533.)就报导了在由劳氏肉瘤病毒引起的鸡的角膜肿瘤形成中，溶菌酶介导了对这一过程的70%的抑制作用。许多其它的实验也说明溶菌酶参与了肿瘤的扩散及与肿瘤细胞的磷酸基和糖脂类分子的相互作用。溶菌酶对人类肿瘤的抑制作用也已见诸报导并取得专利(1980 Jpn Kokai Tokkyo Koho 33, 409.; 1980 Jpn Kokai Tokkyo Koho 33, 408)。至于溶菌酶对肿瘤抑制的机制，有两种可能性，一是溶菌酶直接活化了生物体的免疫功能，二是它间接增强了生物的免疫能力(1989 Anticancer Reserch 9,583-592)。

### 附图简述

图1为本发明的人LYC3与其他溶菌酶的蛋白比较图。其中图1A是人LYC3与 *Trachypithecus francoisi*的溶菌酶C(gi|1790947)的氨基酸序列的同源比较图；图1B是人LYC3与ring-necked pheasant(注：一种雉)的溶菌酶C(sp|p00702)的氨基酸序列的同源比较图。相同的氨基酸在两个序列之间用“:”标出，相似的氨基酸用“。”标出。相似的氨基酸是：A,S,T; D,E; N,Q; R,K; I,L,M,V; F,Y,W。

图2显示了本发明LYC3的溶菌活性。

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件如Sambrook等人，分子克隆：实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

## 5 实施例

### 实施例1

#### LYC3的cDNA序列的克隆和测定

##### 1. 引物扩增

10 以人脑  $\lambda$  gt11cDNA文库(购自Clontech公司)为模板，用一对寡核苷酸为引物，  
——A1: 5'- AGAGTGGTGGTGGCTCCACTCTG -3' (SEQ ID NO: 1)为正向引物，  
寡核苷酸B1: 5'- TGCTGTGCATGGTTCCGTC CATC -3'(SEQ ID NO: 2)为反向引物，进行PCR。PCR条件为93℃ 4分钟，随之以93℃ 1分钟、69℃ 1分钟和72℃ 1分钟进行35个循环，最后72℃ 延伸5分钟。电泳检测得到的PCR片断为544bp的目的  
15 片段。

##### 2. PCR产物的测序

20 将如上获得的PCR扩增产物与pGEM-T®载体(Promega)连接，转化大肠杆菌JM103，用QIAprep Plasmid试剂盒(QIAGEN)提取质粒，用双链嵌套式缺失试剂盒(Pharmacia)对插入片段进行定向系列缺失，然后用PCR对缺失子进行快速鉴定及排序。用SequiTherm EXCEL™ DNA测序试剂盒(Epicentre Technologies)对依次截短的缺失子进行测序，最后用电脑软件拼接顺序，获得全长cDNA序列，共544bp，详细序列见SEQ ID NO: 3，其中开放读框位于81-521位核苷酸。

25 根据得到的全长cDNA序列推导出LYC3的氨基酸序列，共146个氨基酸残基，其氨基酸序列详见SEQ ID NO: 4。

### 实施例2

#### 同源比较

30 用LYC3的全长cDNA序列及其编码蛋白在Non-redundant GenBank+EMBL+DDBJ+PDB数据库及Non-redundant GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+Spupdate+PIR数据库中用BLAST进行核酸和蛋白同源检索。结果发现它们溶菌酶家族成员显示了较高的同源性，如用PCGENE软件

分析, 它与*Trachypithecus francoisi*的溶菌酶C(gi|1790947)在蛋白水平上显示了51.4%的同一性和64.4%的相似性(图1A); 又如, 它与ring-necked pheasant(注: 一种雉)的溶菌酶C(sp|p00702)在蛋白水平上显示了46.6%的同一性和59.2%的相似性(图1B).

5 特别是在LYC3的氨基酸序列中存在由19个氨基酸组成的被认为是溶菌酶和 $\alpha$ 乳清蛋白的特征性序列——CX<sub>3</sub>CX<sub>2</sub>(L/M/F)X<sub>3</sub>(D/E/N)(L/I)X<sub>5</sub>C[注: 该序列中X为任意氨基酸, “2”等数字为氨基酸数目, “(L/M/H)”表示从这3个氨基酸中任选一个氨基酸](溶菌酶和 $\alpha$ 乳清蛋白是在进化上密切相关的两类蛋白(Eur.J.Biochem. 182:111-118)). 在本发明的蛋白中符合上述模式的序列片段是:  
10 CRMYCSDLLNPNLKDTVIC(SEQ ID NO: 4中93-111位). 这更确定了本发明的LYC3也属于溶菌酶家族, 并且具有溶菌酶家族的相关功能.

本发明的人LYC3蛋白有18个氨基酸的信号肽(即SEQ ID NO: 4中1-18位), 去除了信号肽后的成熟人LYC3蛋白具有SEQ ID NO: 4中19-146位的氨基酸序列.

15 溶菌酶可以通过裂解细菌细胞壁的NAM(N-乙酰胞壁酸)和NAG(N-乙酰葡萄糖酸)间的 $\beta$ (1-4)糖苷键而达到裂解细胞的效果. 生物体中溶菌酶作为一种非特异性的免疫分子具有抗细菌感染作用, 在肠道内及一些依靠细菌生存的软体动物中还被作为一种消化酶起作用.

溶菌酶无论在工业上还是在医学上都有重要的用途.

20 首先在工业上(主要是食品工业), 溶菌酶可以作为食品的保鲜剂或添加剂使用. 在这方面, 日本人已做了大量应用并拥有许多专利. 比如他们已将溶菌酶用作新鲜水果蔬菜、豆奶、海洋食品和肉类, 葡萄酒等的保鲜剂. 溶菌酶还可以用作婴儿食品的添加剂以使其更接近人乳的成份(1988 Crit Rev Food Sci Nutr 26(4):359-395).

25 药用方面, 溶菌酶可以用来治疗病毒和细菌感染. 如EDTA-tris-溶菌酶溶液对于治疗大肠菌感染引起的假单孢菌属膀胱炎有效. 人和动物血清中溶菌酶的水平可以作为是否受到感染的一种标志. Zajackowska-Bialowas、Murai等研究了唾液溶菌酶活性和口腔疾病间的关系. 他们的研究显示, 溶菌酶对慢性牙周炎的症状具有明显的缓解作用. 另外, 还发现溶菌酶与某些抗生素具有协同作用, 例如  
30 溶菌酶在单独使用的时候, 即使用量较大对*S.aureus*的溶菌作用也很小, 但在阿莫西林存在的情况下其溶菌作用增强并与溶菌酶的量成正比(1988 Crit Rev Food Sci Nutr 26(4):359-395).

溶菌酶还有抑制肿瘤生长的功能。1955年, Caselli 和Shumacher(1955 Boll Ocul 34:513-533.)就报导了在由劳氏肉瘤病毒引起的鸡的角膜肿瘤形成中, 溶菌酶介导了对这一过程的70%的抑制作用。许多其它的实验也说明溶菌酶与抑制肿瘤的扩散有关(1988 Clin Expl Metastasis 6:245-253; 1998 Folia Oncol 10,suppl A:219-224;1988 Eur J Cancer Clin Oncol24:1737-1743)。溶菌酶还被发现能与肿瘤细胞的磷酸基和糖脂类分子的相互作用(1988 Crit Rev Food Sci Nutr 26(4):359-395)。溶菌酶对人类肿瘤的抑制作用也已见诸报导,Laterza就用溶菌酶成功的治疗了一例手术和放疗后发生转移的小肠网状肉瘤病例(《Atti del II Simposium Internazionale sul Lisozima》, Milano. 7-8-9 1961.Vol I, sez V,pp 49-50); Battaglia 等在用溶菌酶治疗胃癌、前列腺癌、子宫癌、乳房癌的探索中发现, 溶菌酶虽不能使肿瘤体积减小, 但具有明显的减轻疼痛和辅助恢复的作用(《Atti del II Simposium Internazionale sul Lisozima di Fleming》, Milano. 3-4-5 1964.Vol I, sez IV,pp 69-76); 在日本, 溶菌酶在治疗癌症方面的应用已取得专利(1980 Jpn Kokai Tokkyo Koho 33, 409.; 1980 Jpn Kokai Tokkyo Koho 33, 408); 另外, A. Vacca.等  
15 在1985年报道了在化学免疫疗法中使用口服溶菌酶作为免疫调节剂治疗多种骨髓瘤(multiple myeloma)的尝试, 他们的实验显示在接受大剂量溶菌酶治疗的患者中50%的人免疫能力较之对照组增强了(Chemiother IV n.2:147-155,1985)。至于溶菌酶对肿瘤抑制的机制, 有两种可能性, 一是溶菌酶直接活化了生物体的免疫功能, 二是它间接增强了生物的免疫能力(1989 Anticancer Reserch 9,583-592)。

### 实施例3

#### LYC3在大肠杆菌中的表达

编码LYC3的cDNA序列用对应于该DNA序列的5'和3'端的PCR寡核苷酸引物, 用人脑  $\lambda$  gt11cDNA文库(购自Clontech公司)为模板进行扩增, 以合成插入片  
25 段。

5'寡核苷酸引物序列为

5'- TCTCGGATCCATGTTGTTGGCCCTGGTCT -3'(SEQ ID NO: 5),

该引物含有BamHI限制性内切酶的酶切位点, 接之是由起始密码子开始的LYC3编码序列的19个核苷酸;

3 寡核苷酸引物序列为

5 - CCTTGTCGACCTAGAAAGTCACAGCCATCC-3 (SEQ ID NO: 6),

该引物含有SalI限制性内切酶的酶切位点, 一个翻译终止子和LYC3的编码序

列。

限制性内切酶的酶切位点对应于细菌表达载体pQE-9(Qiagen Inc., Chatsworth, CA)上的限制性内切酶酶切位点, 该质粒载体编码抗生素抗性(Amp<sup>r</sup>)、一个细菌复制起点(ori)、一个IPTG-可调启动子/操纵子(P/O)、一个核糖体结合位点(RBS)、  
5 一个6-组氨酸标记物(6-His)以及限制性内切酶克隆位点。

用BamHI和SalI消化pQE-9载体, 随后将插入片段连接到pQE-9载体并保持开放读框在细菌RBS起始。随后用连接混合物转化购自Qiagen, 商品名为M15/rep4的E.coli菌株, M15/rep4含有多拷贝的质粒pREP4, 其表达lacI阻遏物并携带卡那霉素抗性(Kan<sup>r</sup>)。在含有Amp和Kan的LB培养皿上筛选转化子, 在补加Amp(100  
10  $\mu$ g/ml)和Kan(25  $\mu$ g/ml)的LB液体培养基中过夜培养(O/N)含所需构建物的阳性转化子克隆。抽提质粒, 用HindIII酶切鉴定插入片段大小及方向, 测序验证结果表明LYC3的cDNA插入片段已正确装入载体。

过夜(O/N)培养物以1: 100-1: 250的稀释率稀释, 然后接种到大体积培养基中, 培养细胞生长至600光密度(OD<sub>600</sub>)为0.4-0.6时, 加入IPTG(“异丙基硫代- $\beta$ -D-半乳糖苷”)至终浓度为1mM。通过使lacI阻遏物失活, IPTG诱导启动P/O导致  
15 基因表达水平提高。继续培养细胞3-4小时, 随后离心(6000  $\times$  g, 20分钟)。超声裂解培养物, 收集细胞裂解液并将其稀释于6M的盐酸胍中。澄清后, 通过在能使含6-His标记物蛋白紧密结合的条件下, 用镍-螯合柱层析从溶液中纯化溶解的LYC3。用6M盐酸胍(pH5.0)从柱中洗脱LYC3。可用几种方法从盐酸胍中变性沉  
20 淀蛋白。首先, 使用透析步骤除去盐酸胍, 或者从镍-螯合柱中分离出的纯化蛋白可以结合到第二个柱中, 该柱中具有递减的线性盐酸胍梯度。在结合到该柱时蛋白质变性, 随后用盐酸胍(pH5.0)洗脱。最后, 将可溶的蛋白质用PBS进行透析, 然后将蛋白质保存在终浓度为10%(w/v)甘油的贮存液中。

用12%的SDS-PAGE胶进行电泳, 鉴定表达蛋白的分子量大小为16KDa。

25 此外, 用常规方法对表达蛋白的N端和C端各10个氨基酸长度的氨基酸进行测序, 发现与SEQ ID NO: 4的序列一致。

#### 实施例4

LYC3在真核细胞(CHO细胞株)中的表达

30 在该实施例中, 将编码LYC3的cDNA序列用对应于该DNA序列的5'和3'端的PCR寡核苷酸引物, 用人脑  $\lambda$  gt11cDNA文库(购自Clontech公司)为模板进行扩增, 以合成插入片段。

PCR反应中使用的5'寡核苷酸引物序列为:

5'-TCTCAAGCTTATGTTGTTGGCCCTGGTCT- 3'(SEQ ID NO: 7),

该引物含有HindIII限制性内切酶的酶切位点, 接之是由起始密码子开始的LYC3编码序列的19个核苷酸;

5 3'端引物序列为:

5 -CCTTGGATCCCTAGAAAGTCACAGCCATCC- 3 (SEQ ID NO: 8)

该引物含有BamHI限制性内切酶的酶切位点、一个翻译终止子和LYC3的编码序列。

10 引物上的限制性内切酶的酶切位点对应于CHO细胞表达载体pcDNA3上的限制性内切酶酶切位点, 该质粒载体编码抗生素抗性(Amp<sup>r</sup>和Neo<sup>r</sup>)、一个噬菌体复制起点(f1 ori)、一个病毒复制起点(SV40 ori)、一个T7启动子、一个病毒启动子(P-CMV)、一个Sp6启动子、一个SV40启动子、一个SV40加尾信号和相应的polyA顺序、一个BGH加尾信号和相应的polyA顺序。

15 用HindIII、BamHI消化pcDNA3载体, 随后将插入片段连接到pcDNA3载体。随后用连接混合物转化E.coli DH5  $\alpha$  菌株。在含有Amp的LB培养皿上筛选转化子, 在补加Amp(100  $\mu$ g/ml)的LB液体培养基中过夜培养(O/N)含所需构建物的克隆。抽提质粒, 测序验证结果表明LYC3的cDNA插入片段已正确装入载体。

20 质粒转染是采用脂转染法, 用Lipofectin试剂盒(GiBco Life)进行的。转染48小时后, 经2-3周的持续G418加压筛选, 收集细胞及细胞上清测定表达蛋白酶活力。去G418, 连续传代培养; 对混合克隆细胞极限稀释, 选择具有较高蛋白活性的细胞亚克隆。按常规方法大量培养上述阳性亚克隆。48小时后, 开始收集细胞及上清, 用超声裂解方法破碎细胞。以含0.05%Triton的50mM Tris  $\cdot$  HCl(pH7.6)溶液为平衡液及洗脱液, 用经预平衡的Superdex G-75柱收集上述蛋白的活性峰。再用50mM Tris  $\cdot$  HCl(pH8.0)平衡的DEAE-Sepharose柱, 以含0-1M NaCl的50mM  
25 Tris  $\cdot$  HCl(pH8.0)溶液为洗脱液进行梯度洗脱, 收集上述蛋白的活性峰。然后以PBS(pH7.4)为透析液对表达蛋白溶液进行透析。最后冻干保存。

用12%的SDS-PAGE胶进行电泳, 鉴定表达蛋白的分子量大小为15KDa。

同时, 还设计了去除信号肽的5'寡核苷酸引物: 5'-TCTCAAGCTT  
AAGCTCTACG GTCGTTG - 3'(SEQ ID NO: 9)。以SEQ ID NO: 9和8为引物, 重复  
30 上述的实施例4步骤, 同样获得了分子量为15kDa的表达蛋白, 即去除了信号肽的LYC3蛋白。

此外, 用常规方法对表达蛋白的N端和C端各10个氨基酸长度的氨基酸进行测序, 发现与SEQ ID NO: 4的序列一致。



## 实施例5

## 制备抗体

将实施例3或实施例4获得的重组蛋白用来免疫动物以产生抗体，具体如下。  
5 重组分子用层析法进行分离后备用。也可用SDS-PAGE凝胶电泳法进行分离，将电泳条带从凝胶中切下，并用等体积的完全Freund s佐剂乳化。用50-100  $\mu$ g/0.2ml 乳化过的蛋白，对小鼠进行腹膜内注射。14天后，用非完全Freund s佐剂乳化的同样抗原对小鼠以50-100  $\mu$ g/0.2ml的剂量进行腹膜内注射以加强免疫。每隔14天进行一次加强免疫，至少进行三次。获得的抗血清的特异反应活性用它在体外沉淀LYC3基因翻译产物的能力加以评估。  
10

## 实施例6

## LYC3的溶菌作用

按类似于实施例3的方法，设计末端分别带有EcoRI和XhoI位点的引物来扩增  
15 LYC3基因。然后，用EcoRI 和XhoI双酶切LYC3扩增产物，再克隆入pPIC9K载体 (Invitrogen)。接着，用SalI 酶切该载体，按厂商建议的条件电转化巴斯德毕赤氏酵母(*Pichia pastoris*)。根据能否在缺乏His的培养基上生长而筛选出整合有LYC3基因的酵母。

以整合有LYC3基因的巴斯德毕赤氏酵母培养上清液为样品，并作1:1，  
20 1:5,1:10,1:20:1:30,1:50的一系列稀释。同时以未整合LYC3的酵母培养上清液为对照。取100微升样本或对照，37℃预热2min，分别加入37℃预热的底物(0.5M pH6.5 磷酸缓冲液悬浮的艳红标记溶性微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*))在37℃反应20min，加入乳化剂400微升停止反应，4000rpm离心5分钟，取上清，肉眼观察样品与对照，样品明显红于对照。反应液在721型分光光度计上于540nm波长处比色，以  
25 对照为空白管，样品吸光度大于对照。参见图2，图中上方为市售的Sigma的溶菌酶产品(从左至右分别是浓度分别为 $10^{-2}$ 、 $5 \times 10^{-3}$ 、 $2 \times 10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $5 \times 10^{-4}$ 、和 $10^{-4}$ mg的溶菌酶和对照)，下方为本发明的LYC3蛋白的培养上清液(从左至右分别是稀释度为1:1, 1:5,1:10,1:20:1:30,1:50的LYC3上清液和对照)。红颜色越深，表示有越多的细菌被溶解。图2表明，LYC3有溶菌作用。

30 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

## 序列表

## (2)SEQ ID NO: 1的信息

## (i)序列特征

5

(A)长度: 23碱基

(B)类型: 核酸

(C)链性: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 寡核苷酸

10

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 1:

AGAGTGGTGG TGGCTCCACT CTG

23

## (2)SEQ ID NO: 2的信息

## (i)序列特征

15

(A)长度: 23碱基

(B)类型: 核酸

(C)链性: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 寡核苷酸

20

(xi)序列描述: SEQ ID NO : 2

TGCTGTGCAT GGTTCCGTCC ATC

23

## (2)SEQ ID NO: 3的信息:

## (i)序列特征:

25

(A)长度: 544bp

(B)类型: 核酸

(C)链性: 双链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: cDNA

30

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 3

1 AGAGTGGTGG TGGCTCCACT CTGCCGCCGC ATAGAAGCCA GGAGCAGGGC TCTCAGAAGG  
61 CGGTGGTGCC AGCTGGGATC ATGTTGTTGG CCCTGGTCTG TCTGCTCAGC TGCCTGCTAC

121 CCTCCAGTGA GGCCAAGCTC TACGGTCGTT GTGAACTGGC CAGAGTGCTA CATGACTTCG  
 181 GGCTGGACGG ATACCGGGGA TACAGCCTGG CTGACTGGGT CTGCCTTGCT TATTTACAA  
 241 GCGGTTTCAA CGCAGCTGCT TTGGACTACG AGGCTGATGG GAGCACCAAC AACGGGATCT  
 301 TCCAGATCAA CAGCCGGAGG TGGTGCAGCA ACCTCACCCC GAACGTCCCC AACGTGTGCC  
 5 361 GGATGTACTG CTCAGATTTG TTGAATCCTA ATCTCAAGGA TACCGTTATC TGTGCCATGA  
 421 AGATAACCCA AGAGCCTCAG GGTCTGGGTT ACTGGGAGGC CTGGAGGCAT CACTGCCAGG  
 481 GAAAAGACCT CACTGAATGG GTGGATGGCT GTGACTTCTA GGATGGACGG AACCATGCAC  
 541 AGCA

10 (2)SEQ ID NO: 4的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 146个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(D)拓扑结构: 线性

15 (ii)分子类型: 多肽

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 4

1 Met Leu Leu Ala Leu Val Cys Leu Leu Ser Cys Leu Leu Pro Ser  
 16 Ser Glu Ala Lys Leu Tyr Gly Arg Cys Glu Leu Ala Arg Val Leu  
 31 His Asp Phe Gly Leu Asp Gly Tyr Arg Gly Tyr Ser Leu Ala Asp  
 20 46 Trp Val Cys Leu Ala Tyr Phe Thr Ser Gly Phe Asn Ala Ala Ala  
 61 Leu Asp Tyr Glu Ala Asp Gly Ser Thr Asn Asn Gly Ile Phe Gln  
 76 Ile Asn Ser Arg Arg Trp Cys Ser Asn Leu Thr Pro Asn Val Pro  
 91 Asn Val Cys Arg Met Tyr Cys Ser Asp Leu Leu Asn Pro Asn Leu  
 106 Lys Asp Thr Val Ile Cys Ala Met Lys Ile Thr Gln Glu Pro Gln  
 25 121 Gly Leu Gly Tyr Trp Glu Ala Trp Arg His His Cys Gln Gly Lys  
 136 Asp Leu Thr Glu Trp Val Asp Gly Cys Asp Phe

(2)SEQ ID NO: 5的信息

(i)序列特征

30 (A)长度: 29碱基

(B)类型: 核酸

(C)链性: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 寡核苷酸

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 5:

TCTCGGATCC ATGTTGTTGG CCCTGGTCT

29

5

(2)SEQ ID NO: 6的信息

(i)序列特征

(A)长度: 29碱基

(B)类型: 核酸

10

(C)链性: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 寡核苷酸

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 6:

CCTTGTCGAC CTAGAAGTCA CAGCCATCC

29

15

(2)SEQ ID NO: 7的信息

(i)序列特征

(A)长度: 29碱基

(B)类型: 核酸

20

(C)链性: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 寡核苷酸

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 7:

TCTCAAGCTT ATGTTGTTGG CCCTGGTCT

29

25

(2)SEQ ID NO: 8的信息

(i)序列特征

(A)长度: 29碱基

(B)类型: 核酸

30

(C)链性: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 寡核苷酸

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 8:

CCTTGGATCC CTAGAAGTCA CAGCCATCC

29

(2)SEQ ID NO: 9的信息

5

(i)序列特征

(A)长度: 27碱基

(B)类型: 核酸

(C)链性: 单链

(D)拓扑结构: 线性

10

(ii)分子类型: 寡核苷酸

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 9:

TCTCAAGCTT AAGCTCTACG GTCGTTG

27

## 权 利 要 求 书

1. 一种分离出的DNA分子, 其特征在于, 它包括: 编码具有人LYC3蛋白活性的多肽的核苷酸序列,

5 所述的核苷酸序列与SEQ ID NO: 3中从核苷酸81-521位的核苷酸序列有至少70%的同源性; 或者

所述的核苷酸序列能在中度严紧条件下与SEQ ID NO: 3中从核苷酸81-521位的核苷酸序列杂交。

2. 如权利要求1所述的DNA分子, 其特征在于, 所述的序列编码一多肽, 该多肽具有SEQ ID NO: 4所示的序列或SEQ ID NO: 4中20 - 148位氨基酸序列。

3. 如权利要求1所述的DNA分子, 其特征在于, 该序列具有SEQ ID NO: 3中从核苷酸81-521位的核苷酸序列。

4. 一种分离的LYC3蛋白多肽, 其特征在于, 它包括: 具有SEQ ID NO: 4氨基酸序列或SEQ ID NO: 4中20 - 148位氨基酸序列的多肽、或其活性片段, 或其活性衍生物。

5. 如权利要求4所述的多肽, 其特征在于, 该多肽是具有SEQ ID NO: 4序列或SEQ ID NO: 4中20 - 148位氨基酸序列的多肽。

6. 一种载体, 其特征在于, 它含有权利要求1所述的DNA。

7. 一种用权利要求6所述载体转化的宿主细胞。

8. 如权利要求7所述的宿主细胞, 其特征在于, 该细胞是大肠杆菌。

9. 如权利要求7所述的宿主细胞, 其特征在于, 该细胞是真核细胞。

10. 一种产生具有LYC3蛋白活性的多肽的方法, 其特征在于, 该方法包括:

(a) 将编码具有LYC3蛋白活性的多肽的核苷酸序列可操作地连于表达调控序列, 形成LYC3蛋白表达载体, 所述的核苷酸序列与SEQ ID NO: 3中从核苷酸81-521位的核苷酸序列有至少70%的同源性;

(b) 将步骤(a)中的表达载体转入宿主细胞, 形成LYC3蛋白的重组细胞;

(c) 在适合表达LYC3蛋白多肽的条件下, 培养步骤(b)中的重组细胞;

(d) 分离出具有LYC3蛋白活性的多肽。

11. 如权利要求10所述的方法, 其特征在于, 该序列为SEQ ID NO: 3中从核苷酸81-521位。

12. 一种能与权利要求4所述的LYC3蛋白多肽特异性结合的抗体。

13. 一种核苷酸分子, 其特征在于, 它是权利要求1所述DNA分子的反义序列。

14.一种探针分子,其特征在于,它含有权利要求1所述的DNA分子中约8-100个连续核苷酸.

	10	20	30	40	50	60
LYC3	MLLALVCLLSCLLPSSSEAKLYGRCELARVLHDFGLDGYRGYSLADWVCLAYFTSGFNAAA					
	:	..	:	:	.....	.....
gi 1790947	MRALIILGLVLLSVTVQGIKIFERCELARTLKKLGLDGYKGVSLANWVCLAKWESGYNTEA					
	10	20	30	40	50	60

	70	80	90	100	110
LYC3	LDYE-ADGSTNNGIFQINSRRWCSN-LTPNVPNVCRMYCSDLLNPNLKDTVICAMKITQE				
	...	:	:	.....	.....
gi 1790947	TNYNPGDESTDYGIFQINSRYWCNNGKTPGAVDACHISCSALLQNNIADAVACAKRVVSD				
	70	80	90	100	110

	120	130	140
LYC3	PQGLGYWEAWRHHHCQKDLTEWVDGCDF		
	....	:	.....
gi 1790947	PQGIRAWVAWRNHHCQNKDVSQYVKGCGV		
	130	140	

图 1A

	10	20	30	40	50
LYC3	MLLALVCLLSCLLP-SSEAKLYGRCELARVLHDFGLDGYRGYSLADWVCLAYFTSGFNAA				
	:	..	:	:	.....
sp 00702	MRSLLILVL-CFLPLAAPGKVYGRCELAAAMKRMGLDNYRGYSLGNWVCAAKFESNFNTG				
	10	20	30	40	50

	60	70	80	90	100	110
LYC3	ALDYEADGSTNNGIFQINSRRWCSN-LTPNVPNVCRMYCSDLLNPNLKDTVICAMKITQE					
	:	..	.....	.....	.....	.....
sp 00702	ATNRNTDGSTDYGILQINSRWWCNDGRTPGSKNLCHIPCSALLSSDITASVNC AKKIVSD					
	60	70	80	90	100	110

	120	130	140
LYC3	PQGLGYWEAWRHHHCQKDLTEWVDGCDF		
	....	:	.....
sp 00702	GNGMNAWVAWRKHCKGTDVNVWIRGCRL		
	120	130	140

图 1B



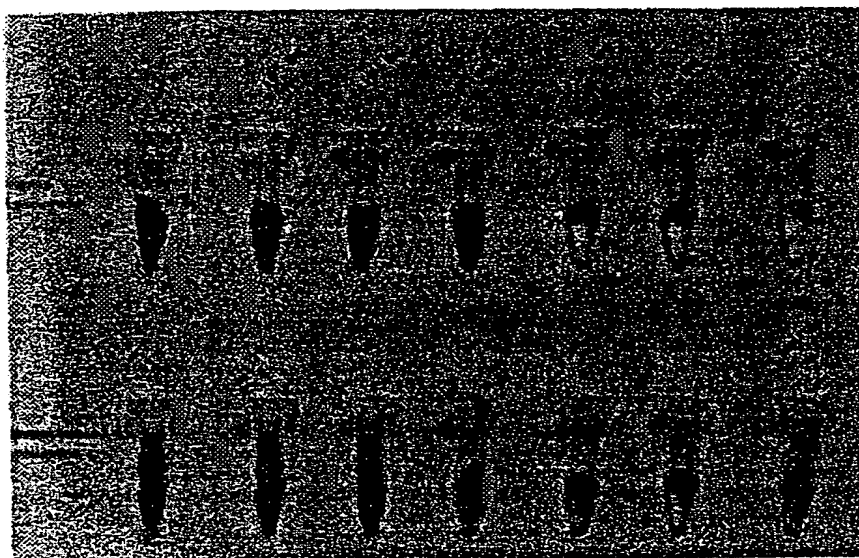


图 2

# 专 利 合 作 条 约

发信人: 国际初步审查单位

## PCT

### 传送国际初步审查报告通知书

(PCT 细则 71.1)

收信人: 200233  
上海市桂平路 435 号知识产权大楼  
上海专利商标事务所

徐迅

发 文 日 10. 8月 2000 (10.08.00)  
(日/月/年)

申请人或代理人的档案号  
982685 1PC

重 要 通 知

国际申请号  
PCT/CN99/00132

国际申请日  
(日/月/年)30.8 月.1999(30.8.99)

优先权日  
(日/月/年)31.8 月.1998(31.8.98)

申请人

余龙, 等

1. 通知申请人, 本国际初步审查单位随本通知传送对国际申请制定的国际初步审查报告及其附件(如果有附件的话)。
2. 报告及其附件(如果有附件的话)的副本同时送交国际局, 以便送达所有选定局。
3. 任何选定局提出要求时, 国际局将作出报告的英文译文(但不是任何附件的译文), 并将该译文传送给这些选定局。

#### 4. 提示

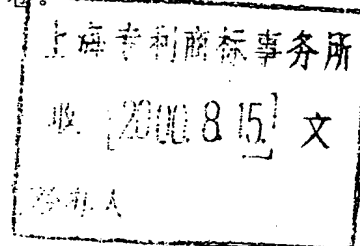
在自优先权日起 30 个月内(或者在有些局更迟)申请人必须完成一定的行为(提交译本和缴纳国家费)进入各选定局的国家阶段(条约第 39 条(1))(参见国际局寄送的 PCT/IB/301 表所附的提示)。

国际申请的译本必须向选定局提供时, 该译本还必须包括国际初步审查报告附件的译文。作出并直接向各有关选定局提供该译文是申请人的责任。

有关各选定局适用的期限和要求的详情, 参见 PCT 申请人指南第 II 卷。

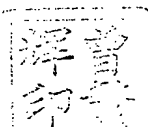
何炯年

瞿小萌 2000年8月15日



国际初步审查单位名称和地址  
中国专利局  
100088 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号  
传真号: 62019451

受权官员  
曾繁辉  
电话号码: 62093733



# 专利合作条约

## PCT

### 国际初步审查报告 (PCT 条约 36 和细则 70)

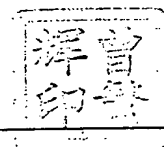
申请人或代理人的档案号 982685 IPC	关于后续行为 参见“传送国际初步审查报告的通知”(PCT/IPEA/416 表)	
国际申请号 PCT/CN99/00132	国际申请日(日/月/年) 30.8 月.1999(30.08.99)	优先权日(日/月/年) 31.8 月.1998(31.08.98)
国际专利分类(IPC)或者国家分类和 IPC 两种分类  Int.Cl <sup>6</sup> : C12N15/56 , C12N9/36 , C07K16/40		
申请人  余龙, 等		

1. 本国际初步审查单位已作出国际初步审查报告并依照条约第 36 条将其传送给申请人。
2. 本报告共计 3 页, 包括扉页。  
☐ 本报告还有附件, 即修改后的并且作为本报告基础的说明书修改页、权利要求书修改页和/或附图修改页, 和/或对本国际初步审查单位所作出的更正页(见 PCT 细则 70.16 和行政规程 607)。  
 这些附件共计        页

3. 本报告包括关于下列各项的内容:

- I ☒ 报告的基础
- II ☐ 优先权
- III ☐ 不作出关于新颖性、创造性和工业实用性的意见
- IV ☐ 缺乏发明的单一性
- V ☒ 按条约 35(2)关于新颖性、创造性或工业实用性的推断性意见; 支持这种意见的引证和解释
- VI ☐ 引用的某些文件
- VII ☐ 国际申请中的某些缺陷
- VIII ☐ 对国际申请的某些意见

提交要求书的日期 27.03 月.2000(27.03.00)	完成本报告的日期 2000 年 5 月 31 日
国际初步审查单位名称和地址 中国知识产权局专利局 100088 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 传真号: 010 - 62019451	受权官员  曾繁辉 电话号码: 62093733



## I. 报告的基础

## 1. 关于国际申请中各个部分：\*

- ☒ 原始提交的国际申请。
- ☐ 说明书，第\_\_\_\_\_页，按原始提交的，  
第\_\_\_\_\_页，随要求书提交的，  
第\_\_\_\_\_页，随\_\_\_\_\_的信件提交的。
- ☐ 权利要求，第\_\_\_\_\_项，原始提交的，  
第\_\_\_\_\_项，按条约第 19 条修改的（附有说明），  
第\_\_\_\_\_项，随要求书提交的。  
第\_\_\_\_\_项，随\_\_\_\_\_的信件提交的。
- ☐ 附图，第\_\_\_\_\_页，原始提交的，  
第\_\_\_\_\_页，随要求书提交的，  
第\_\_\_\_\_页，随\_\_\_\_\_的信件提交的。
- ☐ 说明书中的序列表部分  
第\_\_\_\_\_页，原始要求提交的，  
第\_\_\_\_\_页，随要求书提交的，  
第\_\_\_\_\_页，随\_\_\_\_\_的信件提交的。

## 2. 关于所使用的语言，除本项下另有说明外，本国际初步审查单位所获得的或者已向本国际初步审查单位提交的上述所有部分，所使用的语言均为提交本国际申请时所使用的语言。

本国际初步审查单位所获得的或向本国际初步审查单位提交的这些部分所使用的语言是\_\_\_\_\_，  
这种语言是

- ☐ 为了国际检索而提交的译本所使用的语言（细则 23.1（b））。
- ☐ 本国际申请公布时所使用的语言（细则 48.3（b））。
- ☐ 为了国际初步审查而提交的译本所使用的语言（细则 55.2 和/或 55.3）。

## 3. 关于本国际申请中所公开的任何核甙酸和/或氨基酸的序列，本国际初步审查是根据下面的序列表进行的：

- ☒ 国际申请中所包含的书写形式的序列表。
- ☐ 与国际申请同时提交的计算机可读形式的序列表。
- ☐ 后来以书写形式向本国际初步审查单位提交的序列表。
- ☐ 后来以计算机可读的形式向本国际初步审查单位提交的序列表。
- ☐ 已提交了关于后来提交的书写形式的序列表没有超出原始提交的国际申请所公开的范围的说明。
- ☐ 已提交了关于以计算机可读的形式记载的信息是与书写形式的序列表相同的说明。

## 4. 修改删除了以下内容的：

- ☐ 说明书，第\_\_\_\_\_页
- ☐ 权利要求，第\_\_\_\_\_项
- ☐ 附图，第\_\_\_\_\_页，图\_\_\_\_\_

5. ☐ 由于（某些）修改被认为超出了原始公开的范围，如补充栏所示，因此本报告是按照如同没有修改的情况作出的(细则 70.2(c))。 \*\*

\* 按照条约第 14 条答复通知时向受理局提交的替换页，在本报告中被称为“原始提交的”，这些替换页不作为本报告的附件，因为它们没有包含修改（细则 70.16 和 70.17）。

\*\* 任何包含这种修改的替换页，都必须在第 1 项中指明，并作为本报告的附件。

V. 按条约 35 条(2)关于新颖性、创造性或工业实用性的推断性意见：支持这种意见的引证和解释

1. 意见

新颖性(N)	权利要求	1-14	是
	权利要求		否
创造性(IS)	权利要求	1-14	是
	权利要求		否
工业实用性(IA)	权利要求	1-14	是
	权利要求		否

2. 引证和解释（细则 70.7）

权利要求 1 - 14 所涉及的必要技术特征没有在现有技术中被检索到，而且这些必要技术特征相对于现有技术是非显而易见的，并能在工业上应用。因此权利要求 1 - 14 具有新颖性，创造性和工业实用性。

# PATENT COOPERATION TREATY

From the  
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To:

Xu Xun  
Shanghai Patent & Trademark Law Office  
Guiping Road 435, Shanghai 200433  
P.R.China

## PCT

### NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT (PCT Rule 71.1)

Date of mailing (day/month/year)	10.08.00
-------------------------------------	----------

Applicant's or agent's file reference 982685 1PC	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
---	-------------------------------

International application No. PCT/CN99/00132	International filing date (day/month/year) 30.08.99	Priority date (day/month/year) 31.08.98
---	--	--

Applicant	YU, Long, et al.
-----------	------------------

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary examination report and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.

#### 4. REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

Name and mailing address of the IPEA/ The Chinese Patent Office (IPEA/CN)	Authorized officer  Tel. 62093733
---	---

# PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

### INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference <b>982685 1PC</b>	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. <b>PCT/CN99/00132</b>	International filing date (day/month/year) <b>30.08.99</b>	Priority date (day/month/year) <b>31.08.98</b>
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC  <b>Int. Cl<sup>6</sup>: C12N15/56, C12N9/36, C07K16/40</b>		
Applicant  <b>YU, Long, et al.</b>		
<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <b>3</b> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of    sheets.</p>		
<p>3. This report contains Indications relating to the following items:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>I    <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</li> <li>II   <input type="checkbox"/> Priority</li> <li>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</li> <li>IV   <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</li> <li>V    <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</li> <li>VI   <input type="checkbox"/> Certain documents cited</li> <li>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</li> <li>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</li> </ul>		
Date of submission of the demand  <b>27.03.2000</b>	Date of completion of this report  <b>May 31, 2000</b>	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  <b>The Chinese Patent Office</b>	Authorized officer    Telephone No. <b>62093733</b>	

**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/CN99/00132

---

**I. Basis of the report**

1. This report has been drawn on the basis of *(substitute sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

☒ the international application as originally filed

2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application,  
this IPER was drawn on the basis of the sequence listing:

☒ contained in the international application in printed form



**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/CN99/00132

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

**1. Statement**

Novelty (N)	Yes:	Claims	1-14
	No:	Claims	
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	1-14
	No:	Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	1-14
	No:	Claims	

**2. Citations and explanations**

The essential technical features of Claims 1-14 have not been searched in the prior art.

Moreover, these technical features are not obvious when compared with the prior art, and have industrial applicability. Therefore, Claims 1-14 possess novelty, inventiveness and industrial applicability.

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

REC'D 16 AUG 2000

WIPO

PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

16

Applicant's or agent's file reference 982685 IPC		<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/CN99/00132	International filing date (day/month/year) 30.August 1999(30.08.99)	Priority date (day/month/year) 31.August 1998(31.08.98)	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC		Int.Cl <sup>6</sup> :C12N15/56,C12N9/36,C07K16/40	
Applicant YU,Long, et al.			
<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet. This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and /or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority ( see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of _____ sheets.</p> <p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty ,inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2)with regard to novelty ,inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application.</p>			
Date of submission of the demand 27.March 2000(27.03.00)		Date of completion of this report 31.May 2000 (31.05.00)	
Name and mailing address of the IPEA/CN 6Xitucheng RD.,Jimen Bridge.Haidian District.Beijing.100088 China Facsimile No.86-10-62019451		Authorized officer ZENG,Fanhui Telephone No.86-10-62093733	



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/CN99/00132

## I. Basis of the report

### 1. With regard to the elements of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement) under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1 (b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3 (b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rules 55.2 and / or 55.3).

### 2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☒ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

### 3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

### 4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item I and annexed to this report.

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/CN99/00132

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	_____ 1-14 _____	YES
	Claims	_____	NO
Inventive step (IS)	Claims	_____ 1-14 _____	YES
	Claims	_____	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	_____ 1-14 _____	YES
	Claims	_____	NO

### 2. Citations and explanations (Rule 70.7)

The indispensable technical features involved in claim 1-14 have not been searched in the prior art, and these indispensable technical features are not obvious relative to the prior art and able to apply in industry. So claim 1-14 are novelty, inventive step and industrial applicability.

# 专 利 合 作 条 约

## PCT

### 国际初步审查报告 (PCT 条约 36 和细则 70)

REC'D 16 AUG 2000

WIPO PCT

申请人或代理人的档案号 982685 IPC	关于后续行为 参见“传送国际初步审查报告的通知”(PCT/IPEA/416 表)	
国际申请号 PCT/CN99/00132	国际申请日(日/月/年) 30.8 月.1999(30.08.99)	优先权日(日/月/年) 31.8 月.1998(31.08.98)
国际专利分类(IPC)或者国家分类和 IPC 两种分类  Int.Cl <sup>6</sup> : C12N15/56 , C12N9/36 , C07K16/40		
申请人  余龙, 等		

1. 本国际初步审查单位已作出国际初步审查报告并依照条约第 36 条将其传送给申请人。

2. 本报告共计 3 页, 包括扉页。

☐ 本报告还有附件, 即修改后的并且作为本报告基础的说明书修改页、权利要求书修改页和/或附图修改页, 和/或对本国际初步审查单位所作出的更正页(见 PCT 细则 70.16 和行政规程 607)。

这些附件共计          页

3. 本报告包括关于下列各项的内容:

- I ☒ 报告的基础
- II ☐ 优先权
- III ☐ 不作出关于新颖性、创造性和工业实用性的意见
- IV ☐ 缺乏发明的单一性
- V ☒ 按条约 35(2)关于新颖性、创造性或工业实用性的推断性意见; 支持这种意见的引证和解释
- VI ☐ 引用的某些文件
- VII ☐ 国际申请中的某些缺陷
- VIII ☐ 对国际申请的某些意见

提交要求书的日期 27.03 月.2000(27.03.00)	完成本报告的日期 2000 年 5 月 31 日
国际初步审查单位名称和地址 中国知识产权局专利局 100088 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 传真号: 010 - 62019451	受权官员 曾繁辉 电话号码: 62093733

1. 报告的基础

1. 关于国际申请中各个部分：\*

- ☒ 原始提交的国际申请。
- ☐ 说明书， 第\_\_\_\_\_页，按原始提交的，  
第\_\_\_\_\_页，随要求书提交的，  
第\_\_\_\_\_页，随\_\_\_\_\_的信件提交的。
- ☐ 权利要求，第\_\_\_\_\_项，原始提交的，  
第\_\_\_\_\_项，按条约第 19 条修改的（附有说明），  
第\_\_\_\_\_项，随要求书提交的。  
第\_\_\_\_\_项，随\_\_\_\_\_的信件提交的。
- ☐ 附图， 第\_\_\_\_\_页，原始提交的，  
第\_\_\_\_\_页，随要求书提交的，  
第\_\_\_\_\_页，随\_\_\_\_\_的信件提交的。
- ☐ 说明书中的序列列表部分  
第\_\_\_\_\_页，原始要求提交的，  
第\_\_\_\_\_页，随要求书提交的，  
第\_\_\_\_\_页，随\_\_\_\_\_的信件提交的。

2. 关于所使用的语言，除本项下另有说明外，本国际初步审查单位所获得的或者已向本国际初步审查单位提交的上述所有部分，所使用的语言均为提交本国际申请时所使用的语言。

本国际初步审查单位所获得的或向本国际初步审查单位提交的这些部分所使用的语言是\_\_\_\_\_。  
这种语言是

- ☐ 为了国际检索而提交的译本所使用的语言（细则 23.1（b））。
- ☐ 本国际申请公布时所使用的语言（细则 48.3（b））。
- ☐ 为了国际初步审查而提交的译本所使用的语言（细则 55.2 和/或 55.3）。

3. 关于本国际申请中所公开的任何核武酸和/或氨基酸的序列，本国际初步审查是根据下面的序列列表进行的：

- ☒ 国际申请中所包含的书写形式的序列列表。
- ☐ 与国际申请同时提交的计算机可读形式的序列列表。
- ☐ 后来以书写形式向本国际初步审查单位提交的序列列表。
- ☐ 后来以计算机可读的形式向本国际初步审查单位提交的序列列表。
- ☐ 已提交了关于后来提交的书写形式的序列列表没有超出原始提交的国际申请所公开的范围的说明。
- ☐ 已提交了关于以计算机可读的形式记载的信息是与书写形式的序列列表相同的说明。

4. 修改删除了以下内容的：

- ☐ 说明书， 第\_\_\_\_\_页
- ☐ 权利要求，第\_\_\_\_\_项
- ☐ 附图， 第\_\_\_\_\_页，图\_\_\_\_\_

5. ☐ 由于（某些）修改被认为超出了原始公开的范围，如补充栏所示，因此本报告是按照如同没有修改的情况作出的(细则 70.2(c))。 \*\*

\* 按照条约第 14 条答复通知时向受理局提交的替换页，在本报告中被称为“原始提交的”，这些替换页不作为本报告的附件，因为它们没有包含修改（细则 70.16 和 70.17）。

\*\* 任何包含这种修改的替换页，都必须在第 1 项中指明，并作为本报告的附件。

V. 按条约 35 条(2)关于新颖性、创造性或工业实用性的推断性意见；支持这种意见的引证和解释

1. 意见

新颖性(N)	权利要求	1-14	是
	权利要求		否
创造性(IS)	权利要求	1-14	是
	权利要求		否
工业实用性(IA)	权利要求	1-14	是
	权利要求		否

2. 引证和解释（细则 70.7）

权利要求 1 - 14 所涉及的必要技术特征没有在现有技术中被检索到，而且这些必要技术特征相对于现有技术是非显而易见的，并能在工业上应用。因此权利要求 1 - 14 具有新颖性，创造性和工业实用性。

## 国际检索报告

际申请号

PCT/CN99/00132

## A. 主题的分类

Int.Cl<sup>6</sup>:C12N15/56,C12N9/36,C07K16/40

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

## B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)

GenBank, EMBL, DDBJ, PDB, SwissProt, SPupdate, PIR

## C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 包括相关段落的说明	相关的权利要求编号
A	GenBank AC003687 1998 年 2 月 3 日 见序列。	1 - 14
A	GenBank M25446 1993 年 4 月 28 日 见序列。 或见: 核酸研究, 1978 年 9 月: 5 (9): 3275 - 3294 Sippel AE,等: “体外合成的鸡溶菌酶结构基因序列的克隆。” 见摘要。	1 - 14

☒ 其余文件在 C 栏的续页中列出。☐ 见同族专利附件。

## \* 引用文件的专用类型:

“A” 明确表示了一般现有技术、不认为是特别相关的文件

“E” 在先文件, 但是在国际申请日的同一日或之后公布的

“L” 对优先权要求可能产生怀疑或者用来确定另一篇引用文件的公布日期或其它特殊理由而引用的文件(如详细说明)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他手段的文件

“P” 在国际申请日之前但迟于所要求的优先权日公布的文件

“T” 在国际申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请不相抵触, 但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理

“X” 特别相关的文件: 当该文件被单独使用时, 要求保护的发明不能认为是新颖的或不能认为具有创造性

“Y” 特别相关的文件: 当该文件与其他一篇或多篇这类文件结合在一起, 这种结合对本领域技术人员是显而易见的, 要求保护的发明不能认为具有创造性

“&amp;” 同族专利成员的文件

国际检索实际完成的日期

20.09 月 1999(20.09.99)

国际检索报告邮寄日期

14.10月 1999 (14.10.99)

国际检索单位名称和邮寄地址

中国专利局

中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088)

传真号:

86-010-62019451

受权官员

曾繁辉

电话号码: 86-01-62093733



C(续). 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 包括相关段落的说明	相关的权利要求编号
A	SwissProt P07232 1998 年 7 月 15 日 见序列 或见: 自然, 1997 年 1 月 9 日: 385 (6612): 151 - 154 Messier W, Stewart CB: “灵长类溶菌酶的阵发式适应进化。” 见摘要。	1 - 14
A	SwissProt P79847 1997 年 11 月 1 日 见序列	1 - 14

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN99/00132

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC<sup>6</sup> : C12N15/56,C12N9/36,C07K16/40

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched(classification system followed by classification symbols)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the field searched

Electronic data base consulted during the international search(name of data base and, where practicable, search terms used)

GenBank, EMBL, DDBJ, PDB, SwissProt, SPupdate, PIR

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant claim No.
A	GenBank AC003687 03. FEB. 1998 see the sequence.	1-14
A	GenBank M25446 28. APR. 1993 see the sequence. or in: Nucleic Acids Res 1978 Sep;5(9):3275-3294 Sippel AE, et al: " Cloning of chicken lysozyme structural gene sequences synthesized in vitro." see the abstract.	1-14



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason(as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20.SEP.1999 ( 20.09.99 )

Date of mailing of the international search report

14 October 1999 ( 14.10.99 )

Name and mailing address of the ISA/

The Chinese Patent Office  
6, Xitucheng Road, Haidian District,  
Beijing, 100088, China

Facsimile No. 86-010-62019451

Authorized officer ZENG,Fanhui

Telephone No. 86-010-62093733

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN99/00132

## C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SwissProt P07232 15.JUL.1998 see the sequence. or in: Nature 1997 Jan 9;385(6612):151-154 Messier W, Stewart CB: " Episodic adaptive evolution of primate lysozymes. " see the abstract.	1-14
A	SwissProt P79847 01.NOV.1997 see the sequence.	1-14